

LC/MS Application News No.85

誘導体化/LC/ESIによる ビタミンD3の分析

ビタミンD3は肝油から発見されたビタミンD類の一種で、ビタミンD2であるカルシフェロールの二重結合が還元された化合物です。一般的には卵黄やバター等に多く存在し、ビタミンD3が不足するとクル病になることから抗クル病ビタミンとして知られています。従来ビタミンD群は食品の栄養学的な研究が多く、食品中には大量に存在するため、微量分析は必要ありませんでした。しかし、生体中でビタミンD3が代謝され、その代謝物の一種が骨粗鬆症に有効であることから、ビタミンD3の微量分析やその代謝研究が注目されています。そこで今回はLC/MSによるビタミンD3の分析法の検討を行いました。ビタミンD3は脂溶性で官能基も水酸基のみで大気圧イオン化法では感度が低いため、Fig.1に示したジエン構造に迅速に反応するPTADを使用して誘導体化を行い、ビタミンD3-PTADをESIで分析しました。Fig.1にはTIC及びマススペクトルを示しましたが、プロトン付加の擬分子イオン ($m/z=560$) 及びFig.1の矢印の部分で解裂したM-261 ($m/z=298$) が観察されました。またTICで示した通り、ビタミンD3-PTADは異性体が生じるので、メインピークより保持時間が若干早いピークが観察されました。微量分析においては擬分子イオンをモニターイオンで測定しましたが、Fig.3に示した通り1ppbで検出

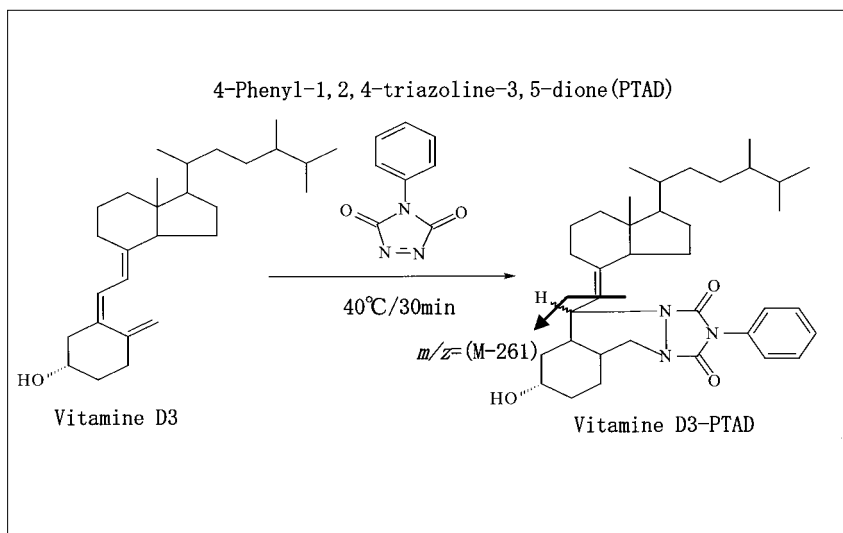


Fig.1 Derivatization of Vitamin D3 with PTAD

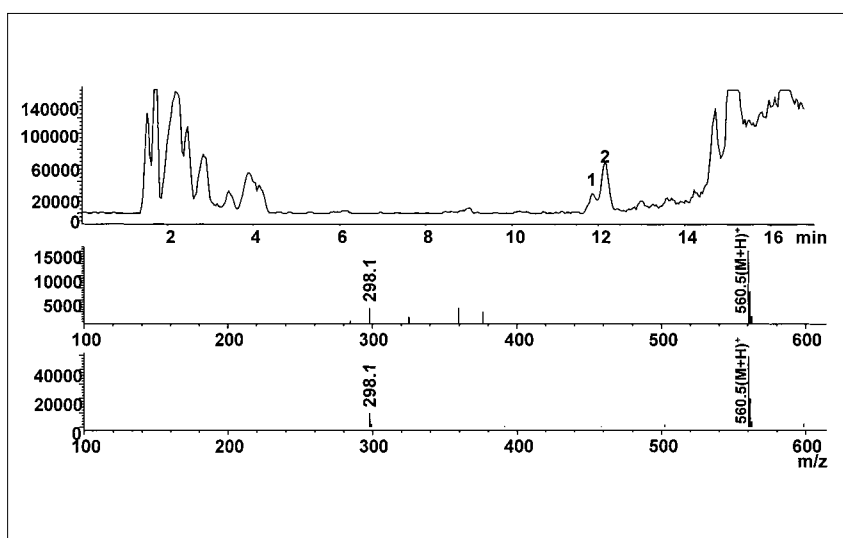


Fig.2 Total ion chromatogram and Mass Spectrum of Vitamin-PTAD(1µg/ml)

が可能でした。Fig.4には卵黄抽出物のSIMクロマトグラムを示しましたが、妨害ピークの影響もなくビタミンD3-PTADの検出が可能

で、定量結果632ppbでした。定量値の再現性も良好で5試行で相対標準偏差は2.1%でした。



Table 1 HPLC and MS conditions

HPLC		MS	
Instrument	: Agilent 1100	Instrument	: Agilent 1100MSD SL
Column	: Zorbax Eclips XDB C8 (150mm, 2.1mm, 5μm)	Mass range	: m/z 100 ~ 700
Mobile phase A	: CH ₃ CN	Ionization	: Electrospray
Mobile phase B	: 10mMCH ₃ COONH ₄	Fragmentor	: 100V
	A / B = 70/30 – (10min) – 100/0	Nebulizer	: N ₂ (50 psi)
Flow rate	: 0.2 ml/min	Drying gas	: N ₂ (10 L/min, 350 °C)
Oven temp.	: 40 °C	Mode	: Positive
Injection Volume	: 10 μl	SIM ions	: m/z=560.5

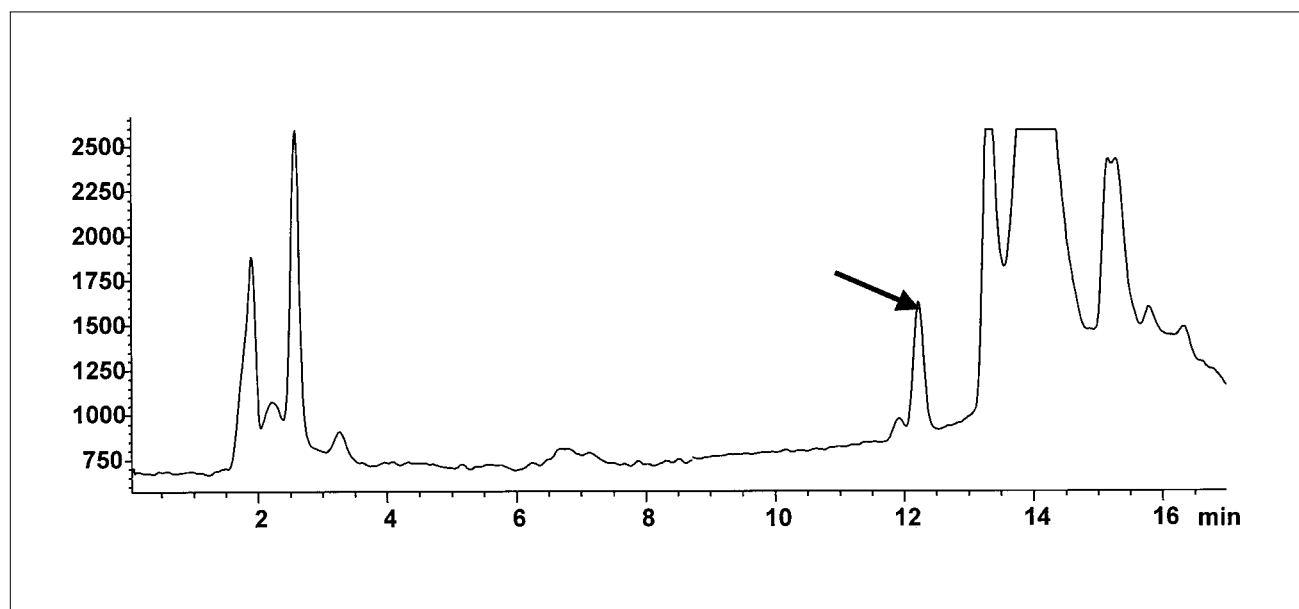


Fig.3 SIM chromatogram of VitaminD3-PATD (1.25ng /ml)

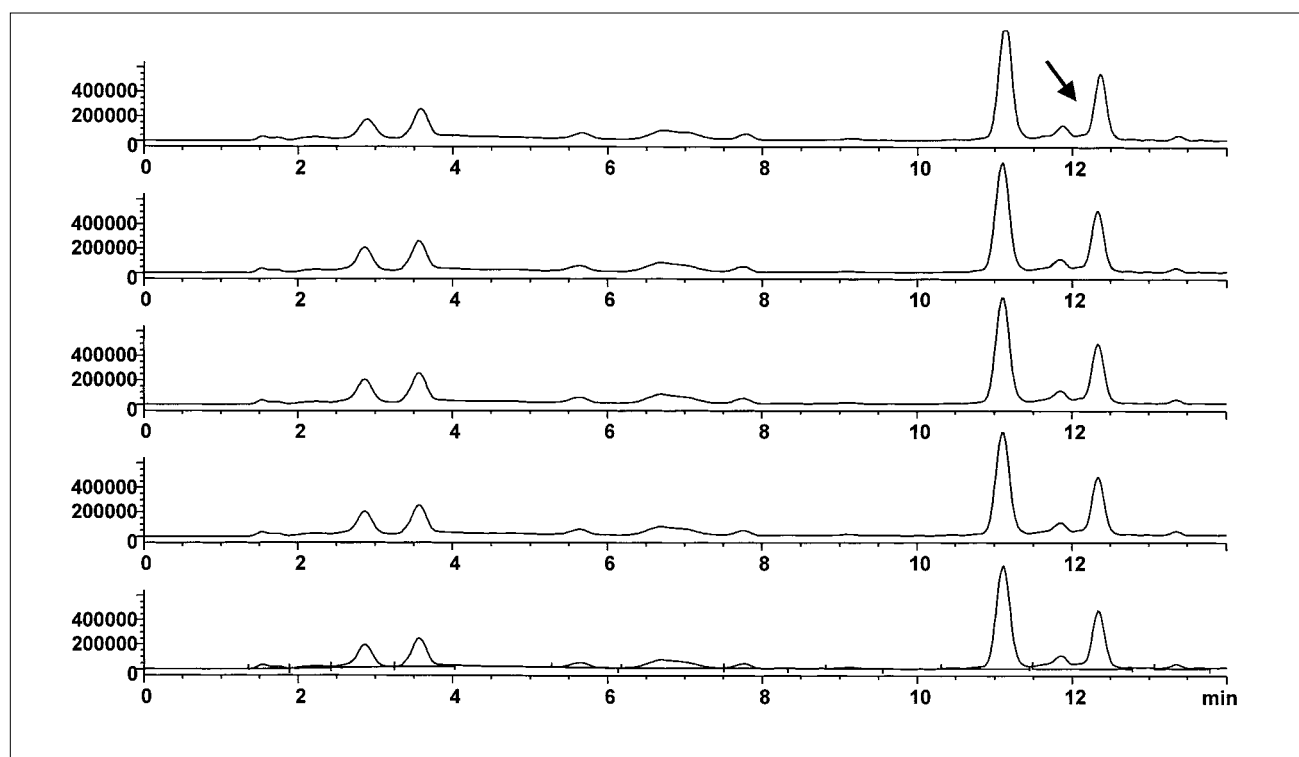


Fig.4 SIM Chromatogram of VitaminD3-PTAD in eggs